



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

RESPOSTAS DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE ETANOL 2G A INIBIDORES LIGNOCELULÓSICOS DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

COLA P¹; PROCÓPIO DP¹; BASSO TO¹

¹ Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, Departamento de Engenharia Química
e-mail para contato: thiagobasso@usp.br

RESUMO – *Inicialmente foram identificados em amostras de hidrolisados industriais, os principais compostos lignocelulósicos inibidores da fermentação alcoólica via cromatografia líquida alta eficiência, sendo eles ácido acético, ácido glicólico, ácido levulínico, HMF, furfural, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido vanílico. Tendo os principais compostos quantificados e identificados, realizou-se um estudo de diferentes concentrações destes inibidores em quatro diferentes linhagens laboratoriais e industriais (CEN.PK113-7D, CEN.PK112, SA-1 e JAY270), a fim de verificar a toxicidade dos mesmos frente aos principais parâmetros cinéticos da fermentação (fase lag e $\mu_{m\acute{a}x}$). De forma geral, a linhagem industrial *S. cerevisiae* SA-1 mostrou-se mais tolerante frente às demais linhagens, em praticamente todas as condições analisadas. Visto que o segundo composto identificado nas amostras foi o ácido p-cumárico um estudo de sua toxicidade frente às leveduras laboratoriais e industriais foi realizado e observado que este composto possui um efeito dose dependente.*

1. INTRODUÇÃO

É esperado que a produção de combustíveis a partir de resíduos lignocelulósicos alcance representatividade na matriz energética mundial. Neste cenário, leveduras desempenharão importante papel como plataformas microbianas para os processos de conversão dos açúcares derivados da biomassa em etanol e em outros produtos de interesse. Apesar dos avanços consideráveis na área, a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos ainda apresenta alguns desafios científicos e tecnológicos, como por exemplo, os problemas enfrentados na fermentação devido à presença de diversos inibidores oriundos dos processos de pré-tratamento e hidrólise da biomassa (tais como furaldeídos, compostos fenólicos e ácidos orgânicos). A geração destes inibidores reduz consideravelmente a eficiência da etapa fermentativa, e muitas vezes, inviabilizam o processo como um todo (Almeida et al., 2007; Della Bianca et al., 2013). Em vista do exposto, o presente trabalho buscou identificar e quantificar os principais compostos inibidores presentes em amostras industriais de hidrolisados, e avaliar o efeito tóxico dos principais compostos identificados em linhagens laboratoriais e industriais da levedura *S. cerevisiae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Identificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados lignocelulósicos

Os ácidos orgânicos foram determinados via HPLC com coluna Biorad HPX 87H, utilizando-se como fase móvel H₂SO₄ (5mM). A análise dos derivados furânicos (furfural e hidroximetilfurfural,) seguiu a metodologia proposta por Gouveia (2009) e os compostos fenólicos com a metodologia de Kammerer et al. (2004).



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo - SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo - SP

2.2. Estudo fisiológico da influência de diferentes concentrações dos principais inibidores lignocelulósicos em linhagens de *S. cerevisiae*

O estudo fisiológico foi realizado em meio definido desenvolvido por Verduyn et al. (1992) e Luttkik et al. (2000), com linhagens laboratoriais e industriais de *S. cerevisiae*. As condições dos experimentos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições testadas em diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

	Inibidor		Tipo de inibidor
	Mínima Concentração (g·L ⁻¹)	Máxima Concentração (g·L ⁻¹)	
Ácido acético	3,00 (50 mM)	12,01 (200 mM)	Ácido orgânico
Ácido levulínico	2,90 (25 mM)	23,22 (200 mM)	Ácido orgânico
Ácido p-cumárico	0,41 (2,5 mM)	1,14 (7,0 mM)	Composto fenólico
Ácido ferúlico	0,09 (0,4 mM)	0,25 (1,3 mM)	Composto fenólico
HMF	2,00 (15,8 mM)	4,00 (31,7 mM)	Derivado furânico
Furfural	1,92 (20 mM)	3,84 (40 mM)	Derivado furânico

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação dos compostos inibitórios presentes em hidrolisados lignocelulósicos

A identificação e quantificação dos compostos inibitórios foi feita a partir dos tempos de retenção de cada um dos compostos em cada detector e de curvas padrão, podendo-se determinar a concentração dos compostos presentes em amostras de hidrolisados industriais (Tabela 2).

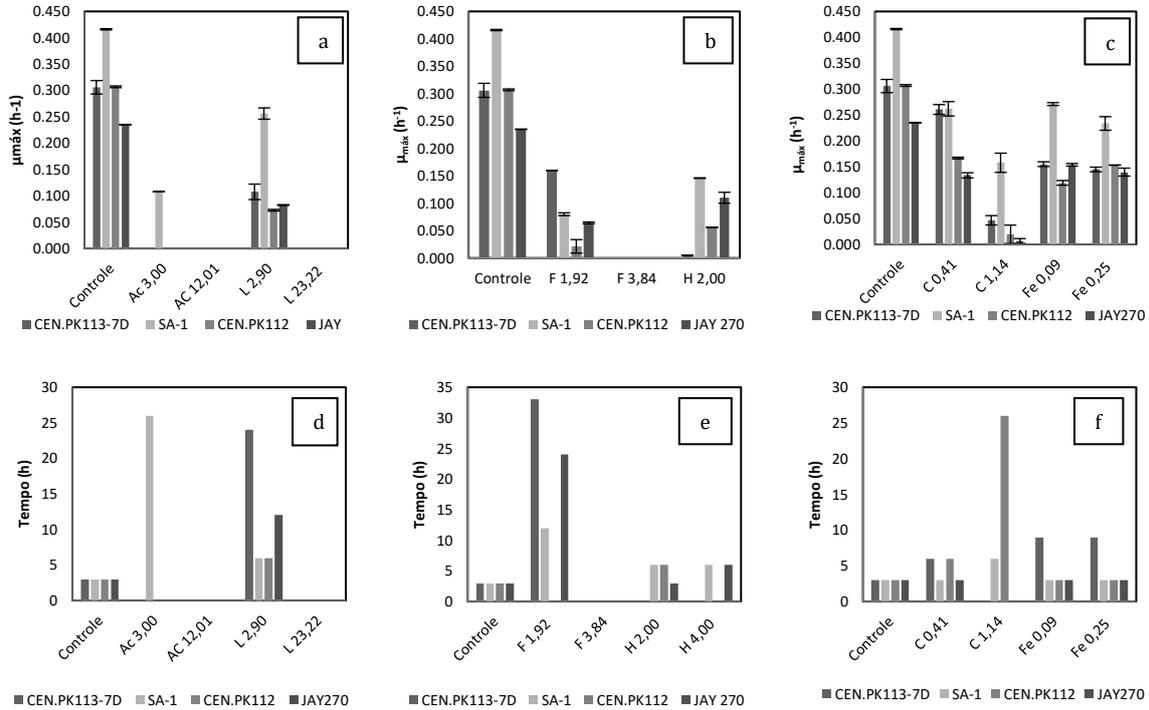
Tabela 1 - Identificação dos compostos inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos industriais.

Inibidor	Concentração em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (g·L ⁻¹)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Ácido glicólico	0.226	1.43	0.39	0.74	0.38
Ácido acético	4.452	8.28	1.90	1.41	6.95
HMF	0,191	0,365	0,047	0,004	0,045
Furfural	0,934	1,066	0,113	0,020	0,008
Ácido p-cumárico	0.420	0.276	0.108	--	0.430
Ácido ferúlico	0.050	0.056	--	--	0.130
Ácido Vanílico	0.050	--	0.044	--	0.130

3.2. Avaliação de diferentes concentrações dos principais inibidores lignocelulósicos em linhagens de *S. cerevisiae* laboratoriais e industriais

O estudo mostrou que a linhagem de *S. cerevisiae* SA-1 foi tolerante em meios contendo compostos inibitórios do que a linhagem referência CEN.PK113-7D, uma vez que a duração da fase *lag* foi menor e a taxa de crescimento maior, na maioria dos casos investigados.

Figura 1 - μ_{\max} e tempo de fase lag nas diferentes concentrações ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de inibidores lignocelulósicos.



Legenda: Ac: Ác. acético; L: Ác. levulínico, F: furfural; H: HMF, C: Ác. p-cumárico; Fe: Áci. ferúlico.

A Figura 1a mostra a robustez da linhagem industrial SA-1 perante as demais com relação aos inibidores da classe de ácidos orgânicos, uma vez que foi a única estirpe onde foi obtido crescimento celular em meio com ácido acético a uma concentração de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, não sendo necessário elevado tempo de fase lag (Figura 1d). A Figura 1b mostra a dificuldade da levedura crescer na presença de furfural, apresentando extensas fases lag (Figura 1e). Onde foi possível observar crescimento, a linhagem SA-1 foi a que apresentou melhor desempenho. Analisando a influência dos compostos fenólicos (Figura 1c) a linhagem SA-1 mostrou-se novamente superior perante as demais, apresentando taxa máxima de crescimento pouco influenciada pela presença do composto inibidor, sendo a única estirpe que apresentou crescimento nesta faixa de concentração de inibidor fenólico, sem grande extensão da fase lag (Figura 1f).

Realizou-se uma varredura de diferentes concentrações (eixo das abscissas em $\text{g}\cdot\text{L}$) do inibidor na levedura laboratorial de referência, CEN.PK 113-7D, onde foi possível observar (Figura 2a) uma taxa limite de toxicidade deste composto de 5 mM . Observa-se na Figura 2b que o inibidor provocou um efeito dose dependente nos parâmetros fisiológicos da levedura estudada.

Figura 2 - μ_{\max} e coeficientes de rendimento em diferentes concentrações de *p*-cumárico (g/L) em CEN.PK13-7D.

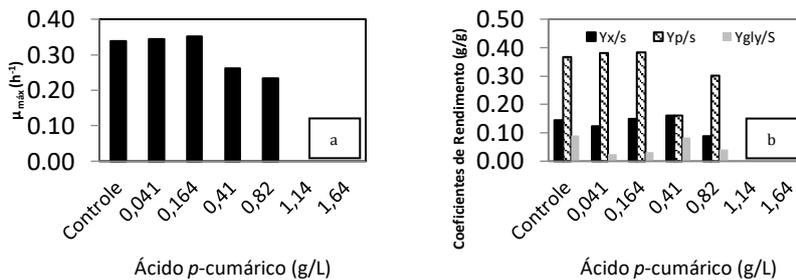
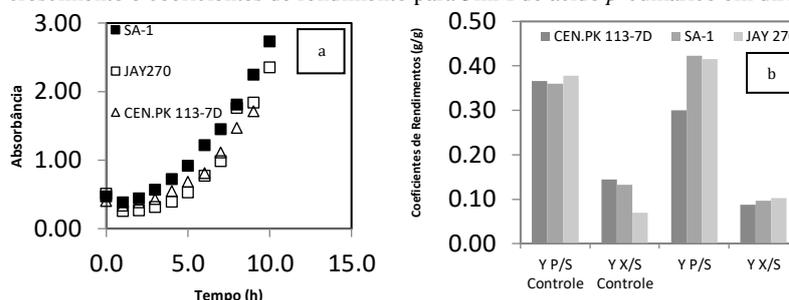


Figura 3 – Curva de crescimento e coeficientes de rendimento para 5mM de ácido *p*-cumárico em diferentes linhagens.



Foram realizados ensaios com leveduras industriais (SA-1 e JAY 270) nesta máxima concentração. Analisando-se as curvas de crescimento e os coeficientes apresentados na Figura 3a e 3b, pode-se notar um melhor desempenho da levedura industrial SA-1.

4. CONCLUSÕES

A avaliação do efeito tóxico de inibidores lignocelulósicos presentes em hidrolisados industriais de bagaço de cana-de-açúcar em 4 diferentes linhagens da levedura *S. cerevisiae* (2 linhagens laboratoriais e 2 industriais), mostrou a maior tolerância da linhagem industrial (SA-1) sobre as demais linhagens. A grande maioria dos inibidores teve um impacto significativamente menor nessa linhagem, este fato corrobora a hipótese de que as linhagens industriais tendem a ser mais resistentes a condições adversas e, portanto, são os melhores candidatos como microrganismos-plataforma (chassis) no desenvolvimento de linhagens para a indústria do etanol 2G. Este estudo também mostrou que, para as concentrações avaliadas, ácidos fracos (como o ácido acético e o levulínico) tiveram o efeito mais inibitório em todas as linhagens estudadas, em relação aos demais compostos avaliados. Os compostos fenólicos, por outro lado, tiveram um menor efeito inibitório nas concentrações estudadas. Analisando a influência do ácido *p*-cumárico, pode-se concluir que ele possui um efeito dose-dependente e que sua taxa máxima de toxicidade suportada pela levedura é de 5mM.

5. Referências

- Almeida, J. R. M.; Modig, T.; Peterson, A.; Hähn-Hägerdal, B.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349. 2007.
- Cunha, J. T.; Aguiar, T. Q.; Romani, A.; Oliveira, C.; Domingues, L. Contribution of *prs3*, *rpb4* and *zwf1* to the resistance of industrial *saccharomyces cerevisiae* CCGU53310 and PE-2 strains to lignocellulosic hydrolysate-derived inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 7-16, 2015.
- Della-Bianca, B. E.; Basso, T. O.; Stambuk, B. U.; Basso, L. C.; Gombert A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology Biotechnology**. V. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.
- Gouveia, E. S et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- Kammerer, D.; Achim C.; Reinhold C.; Andreas S. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera*) By HPLC-DAD-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 14, p. 4360-4367, 2004.
- Luttik, M. A. H.; Kotter, P.; Salomons, F. A.; Van Der Klei, I. J.; Pronk, J. T. The *saccharomyces cerevisiae* *icl2* gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme a metabolism. **Journal of Bacteriology**; 182:7007-13, 2000.
- Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W. A.; Vandijken, J. P. Effect of benzoic-acid on metabolic fluxes in yeasts – a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. V. 8, p. 501-17, 1992.